

PCT/PTO 28 JUN 2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/06321  
21.05.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2002年 6月24日

REC'D 11 JUL 2003

出願番号  
Application Number:

特願2002-183461

[ST.10/C]:

[JP2002-183461]

出願人  
Applicant(s):

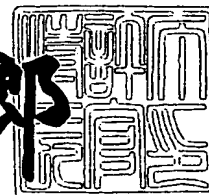
アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3050858

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 R6599

【提出日】 平成14年 6月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 鎌田 達夫

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 和泉澤 裕司

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

特2002-183461

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗酸菌の溶菌方法およびそれを用いた遺伝子の増幅若しくは検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗酸菌から遺伝子を抽出するための溶菌方法であって、前記抗酸菌をリパーゼで処理する脂質分解工程と、非イオン界面活性剤の存在下で前記抗酸菌を加熱する加熱工程とを含む方法。

【請求項2】 前記加熱工程が、前記リパーゼの失活工程を兼ねる請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記脂質分解工程および前記加熱工程が、緩衝液中で実施される請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 前記脂質分解工程および前記加熱工程が、閉鎖系の同一容器内で実施される請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 前記脂質分解工程を行った後、前記加熱工程を行う請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 脂質分解工程の条件が、pH4～8、温度37～60℃および処理時間5～30分間の条件であり、前記加熱工程の条件が、温度37～100で5～30分間の条件である請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記脂質分解工程および前記加熱工程を同時に行う請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 前記脂質分解工程および前記加熱工程の条件が、pH4～8、温度37～60℃および処理時間5～30分間の条件である請求項7記載の方法。

【請求項9】 前記緩衝液中のリパーゼの濃度が、10～10000units/mlである請求項3から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 非イオン界面活性剤が、d-ソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレングリコールp-tert-オクチルフェニルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 前記緩衝液中の前記非イオン界面活性剤の濃度が、0.01～10重量%である請求項3から10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 前記加熱工程が、前記非イオン界面活性剤に加えて金属キレート剤の存在下で行われる請求項1から11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 前記金属キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)および1,2-シクロヘキサンジアミン四酢酸(CyDTA)からなる群から選択された少なくとも一つである請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記緩衝液中の前記金属キレート剤の濃度が、0.1～2.0mMである請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】 溶菌対象となる抗酸菌が、鳥型結核菌(M. avium)、エム・イントラセルラレエ(M. intracellularae)、エム・ゴルドネエ(M. gordonae)、ヒト型結核菌(M. tuberculosis)、エム・カンサシイ(M. kansasii)、エム・フォルツイツム(M. fortuitum)、エム・ケロネエ(M. chelonae)、ウシ型結核菌(M. bovis)、エム・スクロフラセウム(M. scrofulaceum)、パラ結核菌(M. paratuberculosis)、チモテ菌(M. phlei)、エム・マリヌム(M. marinum)、エム・シミエー(M. simiae)、エム・スクロフラセウム(M. scrofulaceum)、エム・スズルガイ(M. szulgai)、らい菌(M. leprae)、エム・キセノピ(M. xenopi)、エム・ウルセランス(M. ulcerans)、鼠らい菌(M. lepraemurium)、エム・フラベセンス(M. flavescens)、エム・テレエ(M. terrae)、エム・ノンクロモジェニクム(M. nonchromogenicum)、エム・マルメンス(M. malmoense)、エム・アジアティクム(M. asiaticum)、エム・ヴァケエ(M. vaccae)、エム・ガストリ(M. gastri)、エム・トリピアル(M. triviale)、エム・ヘモフィラム(M. haemophilum)、エム・アフリカヌム(M. africanum)、エム・サーモレジスタブル(M. thermoresistabile)およびスメ

グマ菌 (M. smegmatis) からなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 抗酸菌を含む生体試料が、痰、髄液、糞、唾液、血液、組織、スワブ、胃洗浄液および尿からなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 抗酸菌の遺伝子を特異的に増幅若しくは検出する方法であって、請求項1から16のいずれかの方法により抗酸菌を溶菌して遺伝子を抽出し、これを試料として遺伝子を特異的に増幅若しくは検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗酸菌の溶菌方法およびそれを用いた遺伝子増幅若しくは検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

結核は、今なお、世界的に重要な細菌性疾患であり、その治療方法のみならず診断方法は極めて重要である。結核の最終的確認は、培養法により行われるが、結核菌の増殖速度は極めて遅いため、培養法の前段階で実施される予備的診断方法の確立が望まれている。このような予備的診断方法として、注目されているのは、ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR法) を適用した方法である。この方法は、結核菌の遺伝子に特異的なプライマーを用い、結核菌の遺伝子を増幅して検出することにより、結核菌の有無を判定する方法である。

【0003】

前記PCR法を適用した予備的診断方法では、その前処理として結核菌を溶菌して遺伝子を抽出する必要がある。従来の溶菌方法としては、例えば、超音波処理、研磨磨砕処理、ガラスビーズとともに行う振盪処理およびフレンチプレス処理等の機械的溶菌方法や、凍結融解若しくはリゾチーム等の酵素を用いて細胞壁を弱体化させた後、強力な界面活性剤若しくは疎水結合を切断するカオトロピック (chaotropic) 試薬で処理する化学的溶菌方法等がある。しかし、結核菌の細

胞壁は頑丈であり、従来の溶菌法では、遺伝子の抽出を十分に行うことができなかった。また、十分な抽出を行うためには、処理条件を過酷なものにする必要があり、それに伴い、特殊な装置や試薬を使用する必要があり、これに加え、処理時間の長期化や操作の煩雑化等の問題があった。また、機械的溶菌方法では、試料液が飛散して、作業者に感染するおそれもある。さらに、従来の溶菌方法は、遺伝子以外の細胞内物質も同時に抽出されるため、遺伝子を精製する必要がある。このような溶菌の問題は、結核菌を含む抗酸菌全体の問題でもある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、特殊な装置や試薬を用いることなく、安全、簡単かつ短時間に抗酸菌を溶菌できる方法の提供を、その目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明の方法は、抗酸菌から遺伝子を抽出するための溶菌方法であって、前記抗酸菌をリパーゼで処理する脂質分解工程と、非イオン界面活性剤の存在下で前記抗酸菌を加熱する加熱工程とを含む方法である。

【0006】

本発明者等は、抗酸菌の細胞壁が脂質を高濃度で含んでいることに着目し、前記本発明に到達した。すなわち、本発明の溶菌方法では、脂質分解工程によって抗酸菌の細胞壁を脆弱化し、加熱工程によって溶菌するのである。本発明の溶菌方法は、カオトロピック試薬等の特別の試薬および超音波装置等のような特別の装置を用いることなく、簡単かつ短時間に溶菌処理を行うことができ、しかも化学的手法であるから試料の飛散の恐れも少なく、安全な方法である。また、本発明の溶菌方法は、遺伝子の精製を行うことなく、そのまま遺伝子増幅若しくは検出処理に移行できる。なお、本発明の溶菌方法は、遺伝子の増幅・検出方法だけでなく、例えば、遺伝子操作等のその他の分野にも適用できる。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を、さらに詳しく説明する。

【0008】

本発明の溶菌方法において、前記加熱工程が、前記リパーゼの失活工程を兼ねることが好ましい。このようにすれば、特別の工程を設けることなくリパーゼを失活でき、溶菌処理につづく遺伝子の増幅若しくは検出処理等に影響を与えるおそれがない。

【0009】

本発明の溶菌方法において、前記脂質分解工程および前記加熱工程が、緩衝液中で実施されることが好ましく、より好ましくは同一の緩衝液中で実施されることである。緩衝液は、特に制限されず、例えば、T r i s 緩衝液、H E P E S 緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、マツキルバイン緩衝液等があげられ、このなかで、T r i s 緩衝液、H E P E S 緩衝液が好ましい。

【0010】

本発明の溶菌方法において、前記脂質分解工程および前記加熱工程が、閉鎖系の同一容器内で実施されることが好ましい。閉鎖系であれば、試料の飛散が防止でき、同一容器内であれば、処理効率が良くなる。

【0011】

本発明の溶菌方法において、前記脂質分解工程を行った後、前記加熱工程を行ってもよく、前記両工程を同時に行ってもよい。前者の場合、例えば、前記脂質分解工程の条件は、p H 4 ~ 8、温度 3 7 ~ 6 0 ° C および処理時間 5 ~ 3 0 分間の条件であり、前記加熱工程の条件は、温度 3 7 ~ 1 0 0 ° C で 5 ~ 3 0 分間の条件であり、好ましくは、前記脂質分解工程の条件は、p H 6 ~ 8、温度 3 7 ~ 5 0 ° C および処理時間 5 ~ 2 0 分間の条件であり、前記加熱工程の条件は、温度 8 0 ~ 1 0 0 ° C で 5 ~ 2 0 分間の条件であり、より好ましくは、前記脂質分解工程の条件は、p H 6 . 5 ~ 7 . 5、温度 3 7 ~ 5 0 ° C および処理時間 1 0 分間の条件であり、前記加熱工程の条件は、温度 9 0 ~ 9 8 ° C で 1 0 分間の条件である。後者の場合、前記脂質分解工程および前記加熱工程の条件は、例えば、p H 4 ~ 8、温度 3 7 ~ 6 0 ° C および処理時間 1 0 ~ 3 0 分間の条件であり、好ましくは、p H 6 ~ 8、温度 3 7 ~ 5 0 ° C および処理時間 1 0 ~ 2 0 分間の条件であり、



より好ましくは、pH6.5～7.5、温度45～50℃および処理時間10～20分間の条件である。

## 【0012】

前記緩衝液中のリパーゼの濃度は、例えば、10～10000units/mlであり、好ましくは、100～2000units/ml、より好ましくは、200～1000units/mlである。使用するリパーゼは、特に制限されないが、例えば、商品名リパーゼR「アマノ」G、商品名リパーゼM「アマノ」10、商品名リパーゼG「アマノ」50、商品名リパーゼAY「アマノ」30G、商品名リパーゼA「アマノ」6等（以上、全て天野製薬(株)製）があり、これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、好ましいのは、商品名リパーゼG「アマノ」50、商品名リパーゼAY「アマノ」30Gであり、より好ましいのは、商品名リパーゼAY「アマノ」30Gである。

## 【0013】

前記緩衝中の前記非イオン界面活性剤の濃度は、例えば、0.01～10重量%であり、好ましくは0.1～2.0重量%であり、より好ましくは0.5～1.0重量%である。

## 【0014】

前記非イオン界面活性剤としては、例えば、Span20, Span40, Span60, Span65, Span80, Span85等（以上、ナカライテスク社製等）のd-ソルビトールの脂肪酸エステル、Tween20, Tween21, Tween40, Tween60, Tween65, Tween80, Tween81, Tween85等（以上、ナカライテスク社製等）のポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、TritonX-100等（ナカライテスク社製等）のポリオキシエチレングリコールp-tert-オクチルフェニルエーテル等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、Tween20、TritonX-100が好ましく、より好ましいのは、TritonX-100である。

## 【0015】

前記加熱工程において、非イオン界面活性剤に加え、さらに、金属キレート剤の存在下で、加熱処理を行うことが好ましい。試料中には、DNase等の遺伝子分解酵素が含まれており、金属キレート剤は、これによる遺伝子の分解を防止する作用等を発揮する。前記液体中の前記金属キレート剤の濃度は、例えば、0.1～2.0mMであり、好ましくは0.5～1.0mMである。前記金属キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)および1,2-シクロヘキサジアミン四酢酸(CyDTA)等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、好ましいのは、EDTA、EGTAであり、より好ましいのは、EDTAである。

#### 【0016】

本発明の溶菌方法の対象となる抗酸菌としては、例えば、鳥型結核菌(M. avium)、エム・イントラセルラレエ(M. intracellulae)、エム・ゴルドネエ(M. gordonae)、ヒト型結核菌(M. tuberculosis)、エム・カンサシイ(M. kansasii)、エム・フォルツイツム(M. fortuitum)、エム・ケロネエ(M. chelonae)、ウシ型結核菌(M. bovis)、エム・スクロフラセウム(M. scrofulaceum)、パラ結核菌(M. paratuberculosis)、チモテ菌(M. phlei)、エム・マリヌム(M. marinum)、エム・シミエー(M. simiae)、エム・スクロフラセウム(M. scrofulaceum)、エム・スズルガイ(M. szulgai)、らい菌(M. leprae)、エム・キセノピ(M. xenopi)、エム・ウルセランス(M. ulcerans)、鼠らい菌(M. lepraemurium)、エム・フラベセンス(M. flavescens)、エム・テレエ(M. terrae)、エム・ノンクロモジェニクム(M. nonchromogenicum)、エム・マルメンス(M. malmoense)、エム・アシアティクム(M. asiaticum)、エム・ヴァケエ(M. vaccae)、エム・ガストリ(M. gastri)、エム・トリビアル(M. triviale)、エム・ヘモフィラム(M. haemophilum)、エム・アフリカヌム(M. africa

num)、エム・サーモレジスタブル (M. thermoresistable) およびスメグマ菌 (M. smegmatis) 等がある。

## 【0017】

本発明の方法において、抗酸菌を含む生体試料としては、例えば、痰、髄液、糞、唾液、血液、組織、スワブ、胃洗浄液、尿等がある。

## 【0018】

つぎに、本発明の方法は、例えば、以下のようにして実施できる。すなわち、まず、前記所定 pH の緩衝液に、リパーゼ、非イオン界面活性剤、必要に応じて EDTA 等の金属キレート剤を添加して溶菌試薬液を調製する。この溶菌試薬液は、オートクレイブにより高压蒸気滅菌することが好ましい。この溶菌試薬液に、試料を添加し、まず、45℃で10分間インキュベーション（脂質分解工程）し、つづいて96℃で10分間インキュベーション（加熱工程）する。前者のインキュベーションにより、抗酸菌の細胞壁が脆弱化し、後者のインキュベーションにより抗酸菌が溶菌すると共に、リパーゼが失活する。前記両インキュベーションの方法は、ヒートブロック、ウォーターバス、サーマルサイ클ラー等により行うことができる。なお、この方法の他に、前記溶菌試薬液に試料を添加し、37～50℃で10～20分間インキュベーションすることにより、脂質分解工程と加熱工程を同時に行ってもよい。

## 【0019】

このようにして溶菌した検体は、そのまま、若しくは前処理を施して遺伝子増幅若しくは検出処理を行うことができる。前記遺伝子増幅若しくは検出方法としては、例えば、PCR法、RT-PCR等のPCRの変法等がある。また、分析対象となる遺伝子としては、DNA、RNAがある。

## 【0020】

## 【実施例】

つぎに、本発明の実施例について比較例と併せて説明する。

## 【0021】

## (実施例1、比較例1)

商品名リパーゼG「アマノ」50（天野製薬社製）および商品名リパーゼAY「ア

マノ」30G（天野製薬社製）を10mM HEPES Buffer(pH7.0)に溶解させてリパーゼ試薬液を調製した。また、溶菌試薬液は、TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)に、TritonX-100（ナカライ社製）を添加して調製し、オートクレーブ滅菌して使用した（以下、TE-Triton試薬という）。試料となる培養BCGは、抗酸菌増殖用液体培地（商品名：MycoBroth、極東製薬工業社製）にて、菌液がマックファーランド1相当の濁度になるまで培養し、これを必要に応じて希釈して調製した。

## 【0022】

前記BCG菌液を、滅菌蒸留水を用いて段階希釈（ $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$ ,  $10^{-2}$ ）して被験菌液を調製した。前記各濃度の菌液を100 $\mu$ Lずつスクリーキャップ付きチューブに分注し、遠心（10,000g, 15分間）してペレット化したものを溶菌反応に用いるサンプル（試料）とした。前記リパーゼ試薬液は、その濃度が、100, 500, 1000, 2000, 3000 (units/mL) の5段階濃度となるように調製した。前記試料に前記各濃度のリパーゼ試薬液を50 $\mu$ L添加し、ボルテックス後、軽く遠心して37 $^{\circ}$ C, 30分間インキュベーションした。次に、TE-Triton試薬（Triton濃度2%）50 $\mu$ Lを添加し、96 $^{\circ}$ C, 20分間で加熱して溶菌処理した。他方、リパーゼ処理を行わない以外は、同様の処理を行ったものを比較例1とした。

## 【0023】

細胞が溶解されたことを確認するため、上記の処理によって得られた溶菌液10 $\mu$ Lのうち、2 $\mu$ LをtemplateとしてPCRを行った。PCRは94 $^{\circ}$ Cで1分間の変性後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間の熱サイクルを30回行った。プライマーの配列、反応液の組成は次の通りである。

## 【0024】

## （PCR反応組成）

10 x Ex-Taq Buffer	2.5	$\mu$ L	
2.5mM dNTP Mixture	2.0	$\mu$ L	
100 $\mu$ M プライマー①	0.125	$\mu$ L	(5' -TCGTCCAGCGCCGCTT-3' )
100 $\mu$ M プライマー②	0.125	$\mu$ L	(5' -CAAAGGCCACGTAGGCGAAC-3' )
Ex-Taq(5u/ $\mu$ L)	0.125	$\mu$ L	

D.W.	18.125 $\mu$ L
各溶菌後サンプル	2.0 $\mu$ L
合計	25.0 $\mu$ L

## 【0025】

前記の増幅反応による産物各 8  $\mu$ L について、3%アガロースゲル電気泳動を行った。その結果を図 1 に示す。なお、同図のレーン番号に流したサンプルは、以下のとおりである。

## 【0026】

(図 1 の説明)

- ① TE-Triton 試薬中での熱処理のみ。
- ② リパーゼ G「77」50 で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。  
リパーゼ 濃度 100 units/mL
- ③ リパーゼ G「77」50 で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。  
リパーゼ 濃度 500 units/mL
- ④ リパーゼ G「77」50 で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。  
リパーゼ 濃度 1,000 units/mL
- ⑤ リパーゼ AY「77」30G で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。  
リパーゼ 濃度 100 units/mL
- ⑥ リパーゼ AY「77」30G で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。  
リパーゼ 濃度 500 units/mL
- ⑦ リパーゼ AY「77」30G で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。  
リパーゼ 濃度 1,000 units/mL

※ 図中の M 印は 100bp ラダー分子量マーカーである。

※ ①～⑦ の領域は、全てレーン左から  $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$ ,  $10^{-2}$  の菌サンプル。

## 【0027】

図 1 からわかるように、TE-Triton 試薬中での熱処理のみの場合 (①、比較例 1) より、リパーゼによる前処理を行った場合 (②～⑦、実施例 1) の方が、溶菌作用が向上している。

## 【 0 0 2 8 】

(実施例 2、実施例 3)

前記 B C G 菌液を、蒸留滅菌水を用いて段階希釈 ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$ ) したものを被験菌液とした。各濃度の菌液を  $100 \mu\text{L}$  ずつスグリュキャップ付きチューブに分注し、遠心 ( $10,000g$ , 15 分間) してペレット化したものを溶菌反応に用いるサンプル (試料) とした。他方、前記 TE-Triton 試薬にリパーゼ AY「 $\gamma\gamma$ 」J30G を  $500 \text{ units/mL}$  の濃度になるように添加したものを溶菌試薬液として用いた。前記試料に前記溶菌試薬  $100 \mu\text{L}$  を添加し、ボルテックス後、軽く遠心した後、 $45^\circ\text{C}$  でインキュベーションした。インキュベーションの時間は 10 分間、30 分間の 2 通り行った。続いて、それぞれ  $96^\circ\text{C}$ , 10 分間で加熱して溶菌処理を行った (実施例 2)。また、リパーゼ処理と熱処理とを同時に行った ( $45^\circ\text{C}$ 、10 分間) 以外は、前述と同様の操作を行ったものを実施例 3 とした。

## 【 0 0 2 9 】

細胞が溶解されたことを確認するため、上記の処理によって得られた溶菌液  $100 \mu\text{L}$  のうち、 $2 \mu\text{L}$  を template として PCR を行った。PCR の条件は、実施例 1 と同様である。前記 PCR 増幅反応産物各  $8 \mu\text{L}$  を 3 % アガロースゲル電気泳動法により確認した。その結果を図 2 に示す。なお、同図のレーン番号に流したサンプルは、以下のとおりである。

## 【 0 0 3 0 】

(図 2 の説明)

①  $\text{Li}^+ - \text{e}^-$  AY「 $\gamma\gamma$ 」J30G と TE-Triton 試薬との混合試薬中でのリパーゼ処理と熱処理との同時処理 (実施例 3)。

②  $\text{Li}^+ - \text{e}^-$  AY「 $\gamma\gamma$ 」J30G と TE-Triton 試薬との混合試薬で処理。

$45^\circ\text{C}$ , 10 分間  $\rightarrow 96^\circ\text{C}$ , 10 分間

③  $\text{Li}^+ - \text{e}^-$  AY「 $\gamma\gamma$ 」J30G と TE-Triton 試薬との混合試薬で処理。

$45^\circ\text{C}$ , 30 分間  $\rightarrow 96^\circ\text{C}$ , 10 分間

④  $\text{Li}^+ - \text{e}^-$  AY「 $\gamma\gamma$ 」J30G で  $37^\circ\text{C}$ , 10 min 処理後、TE-Triton 試薬を添加して  $96^\circ\text{C}$  で 10 分間熱処理。

⑤  $\text{Li}^+ - \text{e}^-$  AY「 $\gamma\gamma$ 」J30G で  $37^\circ\text{C}$ , 10 min 処理後、TE-Triton 試薬を添加して  $96^\circ\text{C}$  で 10

分間熱処理。

※図中のM印は100bpラダー分子量マーカである。

※①～⑦の領域は、全てレーン左から $10^{-4}$ 、 $10^{-3.5}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2.5}$ の菌サンプル

#### 【0031】

図2に示すように、脂質分解処理と加熱処理を同時に行っても（実施例3）、十分に溶菌した。また、脂質分解処理と加熱処理を分けて行くと（実施例2）、さらに溶菌効率が向上した。なお、脂質分解処理のインキュベーション時間の影響は認められず、非イオン性界面活性剤とリパーゼとを同一の緩衝液に溶解させても、問題がなかった。

#### 【0032】

（実施例4）

TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) および Tris Buffer (10mM Tris, pH8.0) に、それぞれ TritonX-100 (ナカライ社製) を1%の濃度になる様に添加し、オートクレーブ滅菌し、EDTA含有試薬およびEDTA無しの試薬を調製した。これらを、以下、それぞれ TE-Triton 試薬 (EDTA 含有) および Tris-Triton 試薬 (EDTA 無し) という。試料となる培養BCGは、抗酸菌増殖用液体培地（商品名：Mycobroth、極東製薬工業社製）にて、菌液がマックファーランド1相当の濁度になるまで培養し、これを必要に応じて希釈して調製した。

#### 【0033】

前記BCG菌液を、蒸留滅菌水を用いて段階希釈 ( $10^{-4.5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-3.5}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2.5}$ ) して被験菌液を調製した。前記各濃度の菌液を100 $\mu$ Lずつスクリーキャップ付きチューブに分注し、遠心 (10,000g, 15分間) してペレット化したものを溶菌反応に用いるサンプル (試料) とした。前記 TE-Triton 試薬 および Tris-Triton 試薬 に、それぞれ リパーゼ AY「77」30G を 500units/mL の濃度になるように添加した。この溶液 100 $\mu$ L を前記試料に添加し、ボルテックス後、軽く遠心した後、45℃でインキュベーションした。インキュベーションの時間は10分間および30分間の2通り行った。続いて、それぞれ96℃、10分間の熱処理を行った。

【0034】

細胞が溶解されたことを確認するため、上記の処理によって得られた溶菌液100 $\mu$ Lのうち、2 $\mu$ LをtemplateとしてPCRを行った。PCRの条件は、実施例1と同様である。前記PCR増幅反応産物各8 $\mu$ Lを3%アガロースゲル電気泳動法により確認した。その結果を図3に示す。なお、同図のレーン番号に流したサンプルは、以下のとおりである。

【0035】

(図3の説明)

①～③：リパーゼ<sup>®</sup>AY「77」30GとTE-Triton試薬との混合試薬で処理（EDTAあり）。

45℃,10分間→96℃,10分間

④～⑥：リパーゼ<sup>®</sup>AY「77」30GとTris-Triton試薬との混合試薬で処理（EDTA無し）

。 45℃,10分間→96℃,10分間

※図中のM印は100bpラダー分子量マーカである。

※①～⑦の領域は、全てレーン左から $10^{-4.5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$ の菌サンプル。

【0036】

図3に示すように、EDTAを用いない場合（④～⑥）であっても、十分に溶菌できた。また、EDTAを使用すれば（①～③）、さらに溶菌効率を上げることができる。

【0037】

【発明の効果】

以上のように、本発明の溶菌方法は、特殊な装置や試薬を用いることなく、安全で簡単かつ短時間に抗酸菌を確実に溶菌できる方法である。したがって、本発明の方法を、遺伝子の増幅・検出法による抗酸菌検査の試料の前処理に適用することにより、検査の効率化を簡単に実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の一実施例の溶菌効果を確認した結果を示す電気泳動の写真である。



【図 2】

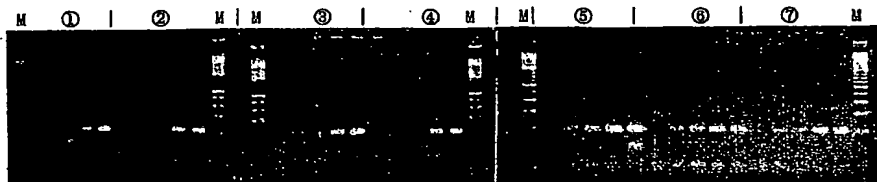
図 2 は、本発明のその他の実施例の溶菌効果を確認した結果を示す電気泳動の  
写真である。

【図 3】

図 3 は、本発明のさらにその他の実施例の溶菌効果を確認した結果を示す電気  
泳動の写真である。

【書類名】 図面

【図 1】



※図中のM印は 100bp ラダー分子量マーカーである。

※①～⑦の領域は、全てレーン左から  $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$ ,  $10^{-2}$  の菌サンプル。

①TE-Triton 試薬中での熱処理のみ。

②リパーゼ G「アマ」50 で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。リパーゼ濃度 100units/mL

③リパーゼ G「アマ」50 で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。リパーゼ濃度 500units/mL

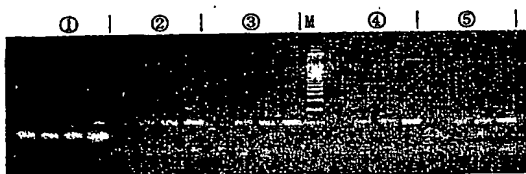
④リパーゼ G「アマ」50 で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。リパーゼ濃度 1,000units/mL

⑤リパーゼ AY「アマ」30G で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。リパーゼ濃度 100units/mL

⑥リパーゼ AY「アマ」30G で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。リパーゼ濃度 500units/mL

⑦リパーゼ AY「アマ」30G で処理後、TE-Triton 試薬中で熱処理。リパーゼ濃度 1,000units/mL

【図 2】



※図中のM印は 100bp ラダー分子量マーカーである。

※①～⑤の領域は、全てレーン左から  $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$  の菌サンプル。

①混合試薬中でのリパーゼ処理と熱処理との同時処理。

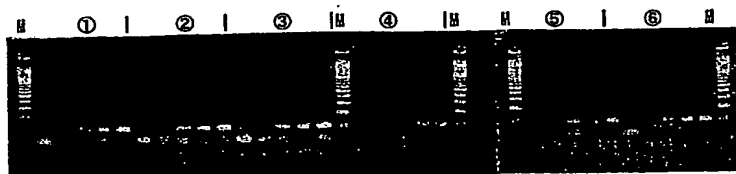
②リパーゼ AY「アマ」30G と TE-Triton 試薬との混合試薬で処理。45℃,10min→96℃,10min

③リパーゼ AY「アマ」30G と TE-Triton 試薬との混合試薬で処理。45℃,30min→96℃,10min

④リパーゼ AY「アマ」30G で 37℃,10min 処理後、TE-Triton 試薬を添加して 96℃,10min 熱処理。

⑤リパーゼ AY「アマ」30G で 37℃,10min 処理後、TE-Triton 試薬を添加して 96℃,10min 熱処理。

【図3】



※図中のM印は100bp ラダー分子重量マーカーである。

※①～⑦の領域は、全てレーン左から  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2.5}$  の菌サンプル。

①～③：リパーゼ AY「アノ」30G と TE-Triton 試薬との混合試薬で処理。45℃, 10min→96℃, 10min (EDTA あり)

④～⑥：リパーゼ AY「アノ」30G と Tris-Triton 試薬との混合試薬で処理。45℃, 10min→96℃, 10min (EDTA なし)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特殊な装置や試薬を用いることなく、安全で簡単かつ短時間に抗酸菌を確実に溶菌できる方法を提供する。

【解決手段】 非イオン性界面活性剤、金属キレート剤およびリパーゼを含有する緩衝液を試料に添加し、まず、37℃～50℃で10分間インキュベーションすることによりリパーゼ処理して抗酸菌細胞壁中の脂質を分解し、ついで、96℃で10分間加熱処理して抗酸菌を溶菌させる。非イオン界面活性剤としては、 $\alpha$ -ソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレングリコール  $p$ - $t$ -オクチルフェニルエーテル等が使用できる。前記緩衝液は、 $pH$  8 が好ましく、金属キレート剤としては EDTA を使用できる。

【選択図】 図 1

特2002-183461

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日	2000年 6月12日
[変更理由]	名称変更
住 所	京都府京都市南区東九条西明田町57番地
氏 名	アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**